

INSTITUT DE ZOOLOGIE, UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL

Directeur : Professeur Jean G. Baer

LABORATOIRE DE CHIMIE BIOLOGIQUE DE L'INSTITUT PASTEUR DE PARIS

Directeur : Professeur Michel Machebeuf

ÉTUDES BIOCHIMIQUES SUR LES PROTÉINES DES *MONIEZIA* PARASITES INTESTINAUX DU MOUTON

THÈSE

présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Neuchâtel
pour l'obtention du grade de Docteur ès Sciences

PAR

FUAD-HASAN NAÏM KENT

Licencié ès Sciences

EXTRAIT DU BULLETIN DE LA SOCIÉTÉ NEUCHÂTELOISE DES SCIENCES NATURELLES

TOME 70

1947

INSTITUT DE ZOOLOGIE, UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL

Directeur : Professeur Jean G. Baer

LABORATOIRE DE CHIMIE BIOLOGIQUE DE L'INSTITUT PASTEUR DE PARIS

Directeur : Professeur Michel Machebeuf

ÉTUDES BIOCHIMIQUES SUR LES PROTÉINES DES *MONIEZIA* PARASITES INTestinaux DU MOUTON

THÈSE

présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Neuchâtel
pour l'obtention du grade de Docteur ès Sciences

PAR

FUAD-HASAN NAÏM KENT

Licencié ès Sciences

EXTRAIT DU BULLETIN DE LA SOCIÉTÉ NEUCHATELOISE DES SCIENCES NATURELLES

TOME 70

1947

A MA FEMME



A Monsieur le professeur
J. G. BAER

A Monsieur le professeur
M. MACHEBCEUF

En témoignage de reconnaissance et de profond respect.

La Faculté des Sciences de l'Université de Neuchâtel, sur le rapport de MM. les professeurs Michel MACHEBŒUF, Jean G. BAER, Adrien PERRET-GENTIL et Jean CLERC, autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont contenues.

Neuchâtel, le 8 juillet 1947.

Le doyen :
Jean G. BAER.

ÉTUDES BIOCHIMIQUES SUR LES PROTÉINES DES *MONIEZIA* PARASITES INTESTINAUX DU MOUTON

par

FUAD-HASAN NAÏM KENT

Licencié ès Sciences

AVEC 1 FIGURE ET 1 PLANCHE

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
Avant-propos	87
Introduction	88
PREMIÈRE PARTIE.	90
Etude des protéines de <i>Moniezia expansa</i>	90
Matériel	90
Mode opératoire.	90
Délipidation	90
Extraction des protéines	90
A. Extraction par l'eau distillée	90
Définitions des fractions π et Σ	91
Alcoololyse de la fraction π	91
Identification de la substance inconnue, liée à la protéine dans la fraction π	92
Etude de la fraction Σ	93
Electrophorèse de la fraction Σ_1	94
Séparation et définition des deux cénapses glycogéno-protéiques <i>Baerine</i> et <i>Moniezine</i>	95

Etude de la fraction Σ_2	96
Tableau récapitulatif et résumé	97
B. Extraction par l'eau salée à 9 pour mille	98
Tableau récapitulatif	99
C. Extraction par l'eau fortement salée (10 pour cent)	100
D. Extraction par l'eau fortement salée (pH 9)	100
Tableau d'ensemble des rendements	101
Conclusion de l'étude des protéines de <i>Moniezia</i>	102
 DEUXIÈME PARTIE	 103
Comparaison du <i>Moniezia expansa</i> et du <i>Taenia saginata</i>	103
Tableau récapitulatif des résultats analytiques obtenus avec <i>Moniezia</i> <i>expansa</i> et <i>Taenia saginata</i>	104
Résumé et rappel des conclusions	105
Bibliographie	107

AVANT-PROPOS

« Le parasite n'est pas un être anormal, exceptionnel, c'est un spécialiste. »

(J. BAER)

Il n'est pas de problème scientifique qui n'attire l'attention du chercheur. Chaque phénomène retient sa curiosité et le pousse à en expliquer le pourquoi. Ainsi, l'étude morphologique et biologique des vers parasites (plathelminthes : Cestodes), que nous avons poursuivie durant nos premières années à l'Institut de Zoologie de l'Université de Neuchâtel, nous avait vivement intéressé.

Pourquoi le parasite est-il un spécialiste ? La résistance des Cestodes parasites vis-à-vis de l'organisme de leur hôte, la localisation spécifique, les réactions provoquées, les conséquences pathologiques sont autant de problèmes que nous discutons longuement avec notre maître, M. le professeur J. G. BAER qui, un jour, nous proposa une étude biochimique sur le métabolisme des plathelminthes parasites. Sur cette suggestion et grâce à l'encouragement de notre maître, nous avons entrepris ce travail.

Cette étude comportera plusieurs étapes dont nous ne présentons ici que la première. Celle-ci constituera notre travail de thèse et, en même temps, la base de recherches qui, espérons-le, permettront ultérieurement de continuer pour donner peut-être un jour une solution à certains problèmes si captivants de la parasitologie.

L'accomplissement de ce travail est dû à l'infinie bienveillance de notre cher maître, Monsieur le professeur J. G. BAER.

Avant de commencer notre exposé, nous tenons à remercier de tout cœur Monsieur le professeur Michel MACHEBŒUF qui, avec une rare compétence, a non seulement dirigé avec M. le professeur BAER le présent travail, mais nous a encore généreusement reçu dans ses laboratoires au Service de Chimie Biologique de l'Institut Pasteur, à Paris. Nous ne saurons jamais lui exprimer toute notre gratitude et notre profonde reconnaissance.

Nous tenons encore à remercier la maison HOFFMANN-LAROCHE à Bâle (Suisse) qui a gracieusement mis à notre disposition les produits nécessaires pour les chromatographies au cours de ce travail.

Nous remercions enfin l'Institut de Zoologie de l'Université de Neuchâtel qui, durant quatre années, nous a reçu sous son toit sympathique.

Le 22 mai 1947.

INTRODUCTION

Plusieurs auteurs ont déjà tenté l'étude de la constitution chimique des différentes espèces de Cestodes, de Trématodes, de Nématodes et d'Acanthocéphales parasites.

Ce sont les Cestodes qui, du point de vue de la morphologie et des études sur le métabolisme, sont les plus intéressants :

« Avec les Cestodes nous nous trouvons en présence de parasites fort anciens se rencontrant, actuellement encore, dans tous les groupes de vertébrés et dont l'anatomie très simplifiée est réduite à l'essentiel pour un parasite, à savoir un appareil de fixation et des organes reproducteurs » (J. G. BAER).

SMORODINTZEV et BEBESHINE (1936) ont montré l'extrême richesse des *Taenias* en glycogène. La même année SMORODINTZEV et PAVLOVA (1936) entreprenaient l'étude des protéines des *Taenias*. Ces auteurs se contentèrent de classer arbitrairement les différentes protéines extraites, en tenant compte uniquement de leurs teneurs en soufre, phosphore et azote. Th. BRAND (1939) fit une brève étude analytique du *Moniezia expansa* (Rud.) et d'un Acanthocéphale. En même temps SALISBURY (1939) étudia la constitution chimique de la larve *Cysticercus fasciolaris*. L'auteur s'occupa surtout des lipides extraits de ces larves. Enfin W. REID (1942) étudia les teneurs en glycogène et en lipides d'un Cestode parasite du Poulet, *Raillietina cesticillus* (Mol.), en fonction du régime alimentaire de l'hôte.

Tous ces auteurs nous ont simplement donné des résultats analytiques quant aux teneurs en azote, sucre, phosphore, lipides, etc... D'autre part, BOYDEN (1934-1942), EISENBRANDT (1938), WRIGHT et GONZALÈS (1943), DESCHIENS (1947) ont étudié le problème du point de vue sérologique. Mais aucune étude ne fut effectuée en vue d'isoler des protéines définies et aussi peu dénaturées que possible. Ni SMORODINTZEV et PAVLOVA, ni SALISBURY, qui ont essayé d'extraire les protéines des vers parasites, n'ont tenu compte de la dénaturation possible ou du danger d'autolyse, lorsque l'on opère à la température du laboratoire (18-20° C). D'autre part, ces auteurs n'ont pas indiqué si le glycogène dosé était libre ou lié à d'autres substances et dans quelles proportions on pouvait le trouver à l'état libre. C'est pourquoi nous avons voulu travailler avec du matériel frais, dans un laboratoire spécialisé et organisé pour l'extraction et l'étude des protéines que nous avons tenté d'isoler pour montrer leurs propriétés.

Or les plathelminthes parasites des vertébrés résistent à l'action des enzymes digestifs de leur hôte. En effet, une larve de Bothriocéphale ou de *Taenia*, ingérée par l'homme, suit son cycle évolutif normalement, sans se soucier de la défense que l'organisme lui oppose. La larve, de même que le ver adulte, va se localiser dans le duodénum sans être résorbée. Nous avons pensé que ce phénomène pourrait découler de la nature ou de l'état des substances protéiques contenues

dans l'organisme de ces curieux parasites qui, « dépourvus de bouche, d'appareil digestif et d'anus, se nourrissent vraisemblablement à travers leur cuticule aux dépens du contenu intestinal de leur hôte » (J. G. BAER).

Nous aurions voulu tout d'abord travailler avec les parasites humains comme le *Taenia saginata* ou le Bothriocéphale, mais la difficulté pour obtenir du matériel abondant et frais nous a obligé à opérer avec des *Moniezia* (essentiellement *M. expansa*) du Mouton, que l'on peut se procurer beaucoup plus facilement et abondamment. Toutefois, nous avons essayé avec de petites quantités de *Taenia saginata* d'établir approximativement une comparaison avec le *Moniezia* en ce qui concerne les protéines (voir deuxième partie).

Nous espérons par la suite reprendre l'étude détaillée des protéines du *Taenia saginata* et celles d'autres espèces, en appliquant les méthodes utilisées au cours de ce travail.

PREMIÈRE PARTIE

Etude des protéines de *Moniezia expansa*

MATÉRIEL

Moniezia expansa du Mouton, prélevé aux abattoirs de Vaugirard, Paris (XV^e).

MODE OPÉRATOIRE

PRINCIPE

Délipidation

Les vers lavés à l'eau physiologique furent congelés (à -18°C), puis pilés dans un mortier en porcelaine, refroidi au préalable. La poudre obtenue fut délipidée par traitement à plusieurs reprises à l'alcool absolu très refroidi (-15°C), puis à l'éther froid.

TECHNIQUE

Les vers sont rapidement lavés sur un entonnoir de BÜCHNER avec de l'eau physiologique, puis placés dans le frigorifique pour se congeler très rapidement. On prépare, d'autre part, de l'alcool absolu refroidi à -15°C ; on mélange une partie de ver en poudre avec 7 parties d'alcool et l'on broie rapidement et fortement (tout en travaillant dans le frigorifique), puis on laisse en contact à basse température (-18°C) pendant 2 à 4 heures en agitant et broyant chaque 15 minutes. On change l'alcool. On laisse macérer encore 4 heures en broyant toujours à basse température, puis on change une troisième et une quatrième fois l'alcool absolu, et on laisse jusqu'au surlendemain au frigo dans l'alcool absolu en agitant de temps en temps. On enlève alors l'alcool et on le remplace par de l'éther absolu en laissant macérer plusieurs fois 4 heures, puis une nuit entière dans l'éther absolu. Le quatrième jour, on enlève l'éther et on l'élimine totalement par évaporation sous vide à froid.

Extraction des protéines

A. EXTRACTION PAR L'EAU DISTILLÉE

La poudre blanche obtenue a été soumise à l'extraction, à plusieurs reprises par de l'eau bidistillée à $+2^{\circ}\text{C}$ à la glacière (en contrôlant chaque fois par la réaction du biuret les protéines extraites), jusqu'à épuisement total de la fraction soluble dans l'eau. L'extraction par l'eau bidistillée est répétée 6 ou 7 fois, si c'est nécessaire avec chaque fois contact de 4 heures au moins.

Les solutions aqueuses obtenues sont volumineuses (7 litres dans l'une de nos expériences) ; nous les avons soumises à la dialyse pour éliminer toutes les substances diffusibles. L'opération fut conduite dans de grands cylindres de viscose, entourés d'une toile cousue bien adaptée. Il fut ainsi possible d'appliquer dans les sacs de dialyse une surpression élevée, de 1,25 atmosphère, qui provoquait une forte exsmose. Les solutions protéiques se concentrèrent ainsi rapidement et, après 7 jours, le volume total n'était plus que de 300 ml, alors que le volume primitif était de 7 litres. Pour éviter toute culture microbienne pendant la dialyse, celle-ci fut opérée dans une glacière à $+2^{\circ}\text{C}$ et tous les liquides étaient saturés de toluène.

Pendant cette dialyse, il est apparu un abondant précipité blanc que l'on sépara par centrifugation. Ce précipité n'avait pas pris naissance simplement par suite de la diminution de volume du solvant, car il ne se dissout pas si on le remet en présence d'un grand volume d'eau bidistillée. Il ne se dissout d'ailleurs pas non plus dans de l'eau salée à 9 ‰ ou même à 20 ‰, ni dans un tampon phosphaté M/30 à pH 7,15. Il est donc probable que ce précipité s'est formé par dissociation pendant la dialyse d'une combinaison soluble dont la dialyse a éliminé un constituant indispensable au maintien en solution. Il se peut également que l'insolubilisation pendant la dialyse soit due à un réarrangement moléculaire tel que ceux que l'on observe lorsqu'on soumet du sérum sanguin de mammifère à la même opération. Dans ce cas bien étudié par SANDOR (1933), on voit à chacune des dialyses successives les solutions euglobuliniques laisser des fractions insolubles. Un autre exemple de précipitation irréversible par dialyse est fourni par les travaux de MACHEBŒUF et TAYEAU (1942), puis de MACHEBŒUF et HELLOT (1947) sur les protéines de la graine d'Arachide.

Nous désignerons par π le précipité formé pendant la dialyse et par Σ le liquide surnageant.

Le précipité π séché ne contient que 8,6 % d'azote ; ce chiffre est beaucoup trop faible pour qu'il s'agisse d'une protéine pure. Nous avons donc recherché les diverses impuretés que l'on trouve habituellement dans les fractions protéiques. Il n'y a pas trace de phosphore et, après hydrolyse acide, on ne trouve pas de sucre réducteur. Comme nous avons pris la précaution de délipider les vers par l'alcool froid et l'éther, avant d'extraire les protéines, nous ne pensions pas qu'il pouvait s'agir de lipides unis aux protéines. Il s'agissait donc d'une impureté inconnue très abondante. Nous avons cherché à la séparer des protéines. Après divers essais infructueux, nous avons enfin tenté une alcoolyse prolongée de la fraction π , qui nous a donné satisfaction.

Alcoolyse de la fraction π .

Un échantillon de 30 mg de π fut traité à plusieurs reprises par dix fois son volume d'alcool absolu bouillant, pendant 40 heures à reflux.

La protéine coagulée et dénaturée prenait progressivement une coloration rose-rouge pâle, tandis que des substances passaient en solution

dans l'alcool. La solution alcoolique fut concentrée, puis évaporée sous vide. Nous avons ainsi obtenu une substance organique solide, qui, au microscope polarisant, se montre douée d'une biréfringence nette sans qu'apparaissent des cristaux bien formés.

Pour 30 mg de π , nous avons recueilli 13 mg de cette substance π_1 . Nous avons en outre étudié le résidu protéique rougeâtre π_2 : nous l'avons soumis à une hydrolyse acide. Nous avons fait l'étude microchromatographique des aminoacides libérés, en employant la technique de CONSDEN, GORDON and MARTIN (1944) (sur papier), légèrement modifiée et adaptée à notre cas particulier.

Le microchromatogramme obtenu nous montre (voir planche) la présence de nombreux acides aminés (10 au moins) ce qui prouve que π_2 est bien une protéine. Sa teneur en azote est d'ailleurs 13 % (au lieu de 8,6 % dans π).

Identification de la substance inconnue, liée à la protéine dans la fraction π et séparée par alcoolyse.

Il s'agit bien d'une substance organique car, par microcalcination, elle charbonne et ne laisse aucun résidu. Elle ne contient pas de phosphore et elle est assez pauvre en azote et en soufre pour que les réactions de LASSAIGNE, effectuées sur 1 mg, donnent des résultats négatifs. Son hydrolyse ne libère aucun ose. Elle ne donne pas de réaction colorée par la technique de LIEBERMANN-BURCKHARDT, ce qui démontre qu'il ne s'agit pas de cholestérol, ni d'un stérol voisin. Elle n'est pas riche en liaisons éthyléniques, car elle ne fixe pas, par addition, de brome en quantité appréciable dans une réaction microanalytique portant sur 1 mg de matière.

Pour guider nos tentatives d'identification, nous avons observé les propriétés physiques de la matière inconnue π_1 ; nous avons constaté qu'elle se dissolvait bien dans l'alcool et le chloroforme, assez bien dans l'eau et que la solution aqueuse moussait abondamment. Parmi toutes les substances chimiques connues, il en est peu qui répondent à tous les caractères analytiques et physiques que nous venons de décrire. Les acides biliaires étaient parmi les possibilités. Nous avons donc recherché si notre substance inconnue π_1 n'était pas l'un d'eux et nous avons pu facilement obtenir avec intensité la réaction de PETTENKOFFER qui nous a prouvé que π_1 contenait effectivement en abondance un acide biliaire typique. Nous n'avions eu en mains que 30 mg de π_1 pour effectuer les analyses et réactions ci-dessus décrites. Il nous était impossible de poursuivre plus avant l'identification et nous ne pouvons pas encore préciser si nous avons affaire à de l'acide cholalique, à de l'acide glycocholique, à de l'acide taurocholique, à de l'acide lithocholique, ou à un acide voisin, ou bien à un mélange de quelques-uns de ces acides.

Nous pouvons cependant déjà préciser que π_1 est bien constitué à peu près uniquement par un ou des acides biliaires, car si l'on opère parallèlement la microréaction de PETTENKOFFER sur des poids égaux

de π_1 et de divers acides biliaires (cholaliques, glycocholique, taurocholique), les intensités des teintes obtenues sont de même ordre. Tout au plus peut-on dire, par exemple, que le résultat pour π_1 correspond à peu près aux trois quarts du résultat donné par un poids égal d'acide taurocholique pur. Or on sait que l'intensité de la réaction n'est pas exactement la même pour les divers acides biliaires.

Résumé. — La fraction π est une cénapse constituée par une protéine typique, unie à un (ou à des) acide biliaire qui représente à peu près 43 % de l'ensemble. Ce fait nous paraît intéressant, car nous voyons ici *pour la première fois l'isolement d'une cénapse de ce type.*

Des travaux antérieurs et en particulier ceux de TAYEAU (1944) avaient fait soupçonner l'existence de cénapses protéines-acides biliaires dans le sang des icteriques, mais leur isolement n'avait pas été tenté. VONK (1947) a entrevu l'action des acides biliaires sur les protéines, chez les Ecrevisses.

Les *Taenias* vivent dans l'intestin, dans un liquide très riche en acides biliaires. Peut-être faut-il chercher là la source de celui ou de ceux qui sont liés à certaines de leurs protéines constitutives. Il est, d'autre part, probable que le fait d'être cénapsées avec une importante proportion d'acides biliaires doit conférer aux protéines π des propriétés très particulières. Peut-être est-ce à ce fait que ces protéines doivent leur résistance aux sucs digestifs, mais nous n'avons pas encore abordé ce côté du problème.

Étude de la fraction Σ .

Le pH du liquide surnageant le précipité π était 5,8. Nous avons ramené ce pH à 6,5, puis précipité Σ_1 par du sulfate d'ammonium à la concentration de 44,6 % (déterminée par des essais préliminaires¹).

Par centrifugation, nous avons obtenu un précipité blanc verdâtre assez abondant. Nous avons dissous ce précipité dans de l'eau bidistillée (la solution était très opalescente). Après élimination du sulfate d'ammonium par des dialyses prolongées contre une solution de sulfate de soude à 2 %, puis contre de l'eau bidistillée (l'élimination du sulfate étant chaque fois contrôlée par le réactif de NESSLER jusqu'à disparition totale), nous avons dosé l'azote (microméthode d'après KJELDHAL) et nous n'avons trouvé que 10 %. Ici encore, par conséquent, nous n'avons pas affaire à une protéine isolée. Nous pensâmes immédiatement aux acides biliaires, mais nous n'en avons pas décelé. Nous avons alors recherché le glycogène dont on connaît l'abondance dans les *Ténias*. La solution aqueuse de Σ_1 est opalescente et elle se colore en brun par l'iode ; cette teinte disparaît par chauffage et reparait par refroidissement. La solution de Σ_1 ne réduit pas la liqueur cuproalcaline, mais il suffit d'une brève hydrolyse acide pour qu'apparaisse un pouvoir réducteur intense. Ce pouvoir réducteur est bien dû à du

¹ Dans ces essais préliminaires, nous avons cherché, par addition progressive de sulfate d'ammonium, la concentration qui convenait pour la précipitation d'une fraction abondante et bien différenciée.

glucose, car nous avons pu préparer et identifier de la glucosazone à partir des produits d'hydrolyse acide de Σ_1 .

Le dosage du glucose dans les produits d'hydrolyse de Σ_1 fut effectué par la microméthode colorimétrique de FOLIN (1928) (adaptée par nous à l'électrophotomètre de MEUNIER).

Les différents dosages d'azote et de sucre (calculés en glucose) nous ont donné en moyenne les résultats suivants :

Fraction	N % *	Sucre % *
Σ	10	32

* Calculés par rapport au poids de l'échantillon séché.

Avions-nous affaire simplement à un précipité constitué par un mélange de protéines et de glycogène ou bien à des cénapses glycogéno-protéiques comparables à celles dont PRZYLECKY (1931-1934), puis WILLSTAETTER et RHODEWALD (1934) ont montré l'existence dans le muscle des mammifères ? Pour résoudre ce problème, nous nous sommes adressés à l'électrophorèse selon le principe de TISELIUS (1930-1932) dans l'appareil de MACHEBŒUF et MONNIER (1941), auquel nous avons adapté le système décrit par SWYNGHEDAU. L'opalescence intense de nos solutions nous empêcha l'observation optique de ce qui restait en arrière de la frontière de tête, mais nous avons pu observer qu'il ne se propageait aucune substance, quelle qu'elle soit, en avant de la frontière limitant l'opalescence, car il ne se détacha jamais de frontière en avant de la zone opalescente. Il nous fut très facile d'observer simplement à l'œil nu la subdivision de notre frontière de tête en deux, car celle qui resta en arrière dans la branche anodique délimitait avec une netteté remarquable une zone faiblement opalescente d'avec une zone fortement opalescente. Il en fut de même dans la branche cathodique où apparurent deux frontières très nettes.

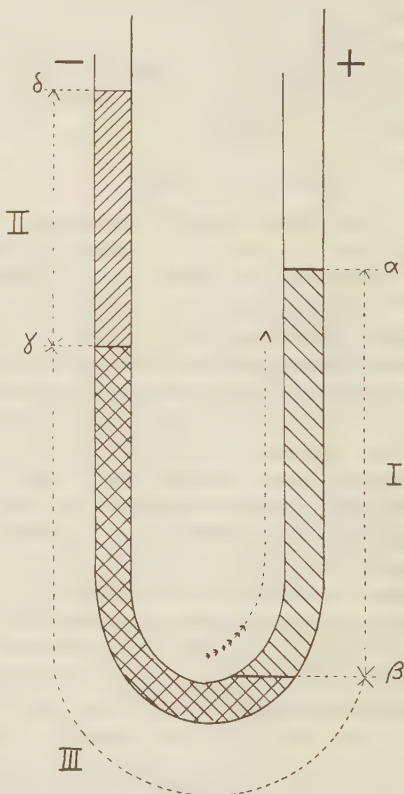
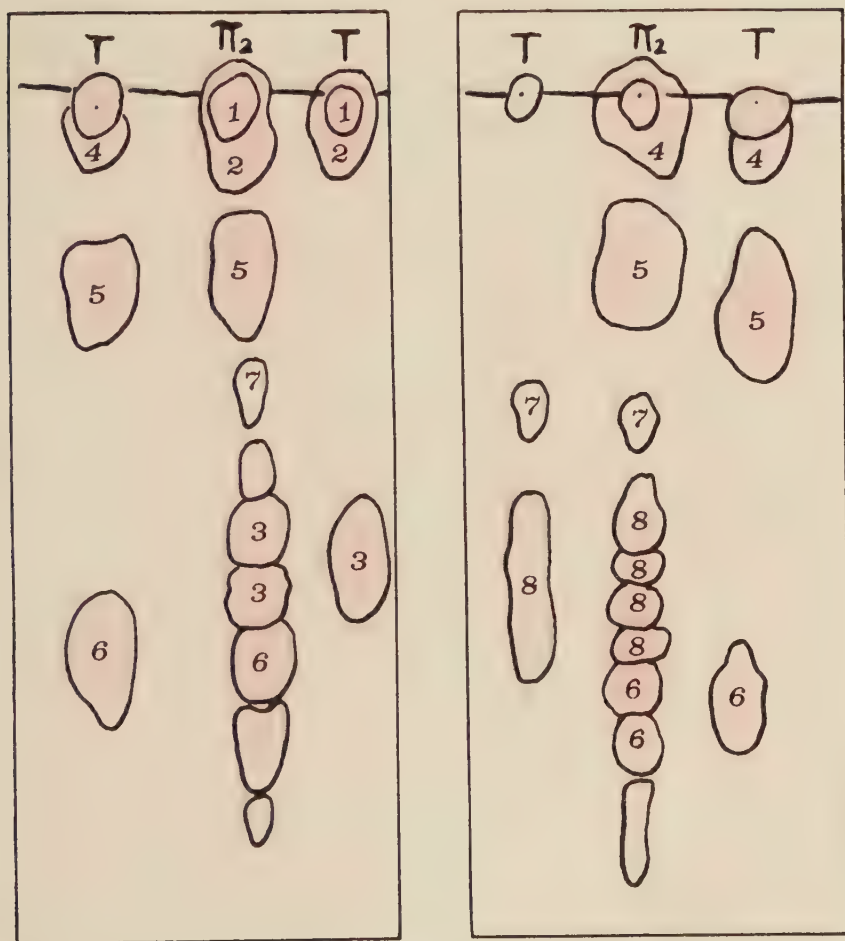


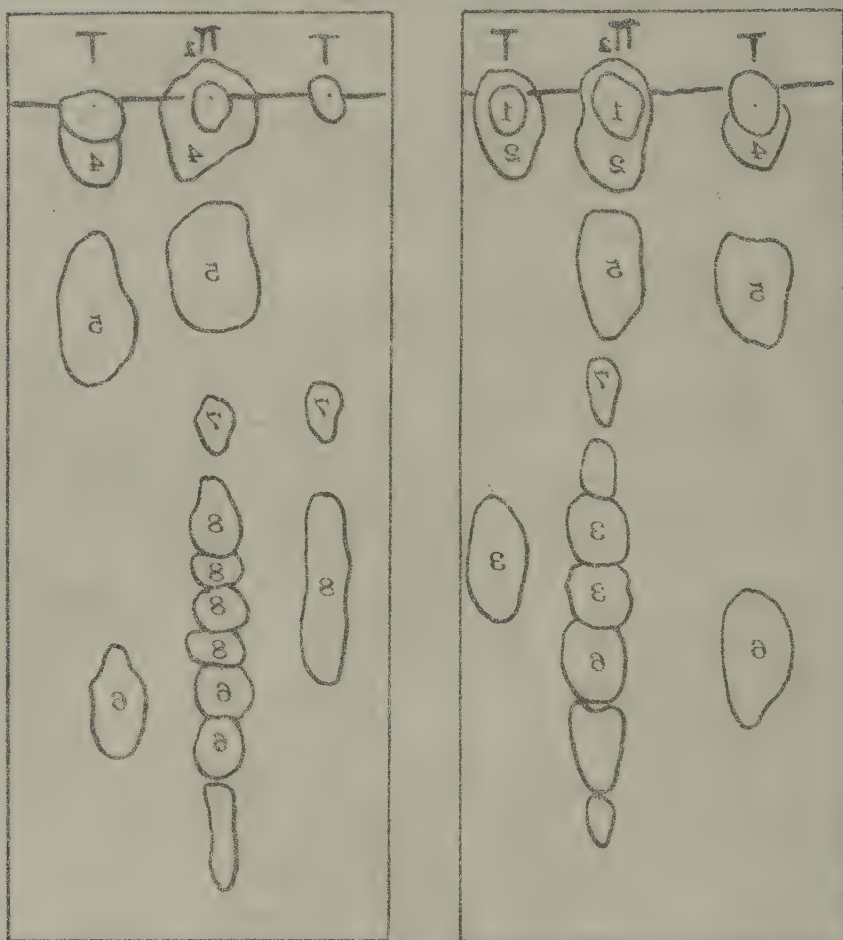
FIG. 1.

Microchromatogramme de la fraction π_2

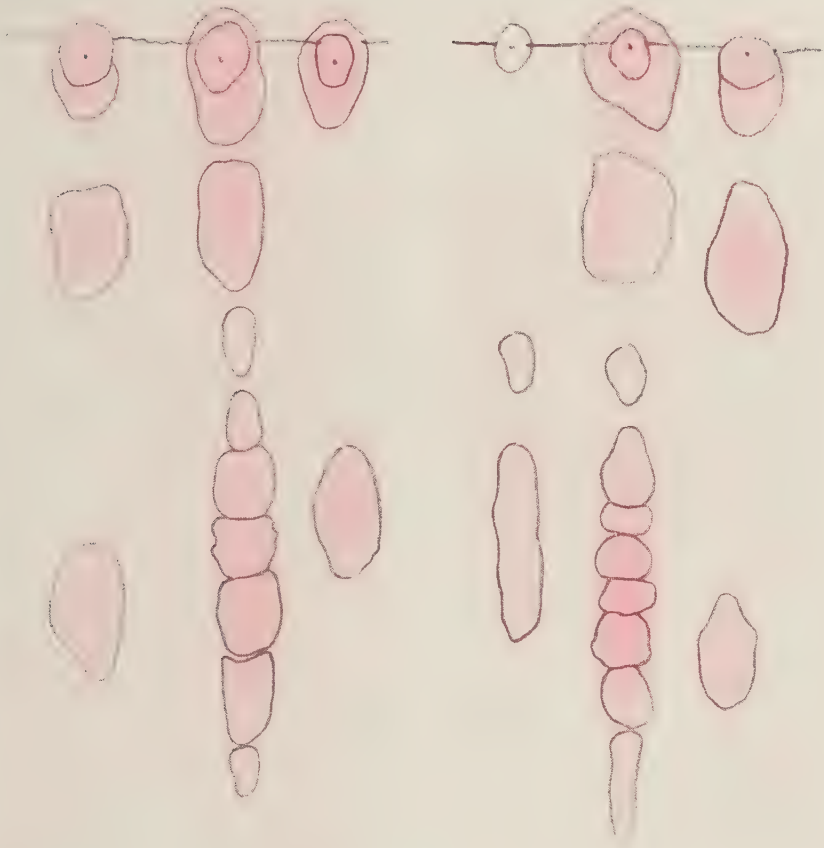


(T) = Témoins. π_2 = Substance protéique. 1 = Acide aspartique. 2 = Acide glutamique. 3 = Valine. 4 = Sérine. 5 = Alanine. 6 = Leucine. 7 = Histidine. 8 = Arginine.

Microchromatogramme de la fraction No 6



(1) Tyrosine, (2) Aspartic acid, (3) Alanine, (4) Leucine, (5) Histidine.
 6 - Arginine, 7 - Glutamic acid, 8 - Valine, 9 - Serine, 10 - Alanine, 11 - Leucine, 12 - Histidine.



Pour réaliser ces expériences, nous avons dialysé la solution de la fraction Σ_1 contre un tampon phosphaté M/30 à pH 7,15 pendant 48 heures à la glacière, puis nous avons procédé à l'électrophorèse. Nous avons observé deux frontières montantes dans la branche anodique, et deux descendantes dans la branche cathodique, toutes remarquablement nettes et stables. Tout se passe comme si nous avions affaire à un simple mélange de deux protéines seulement, homogènes l'une et l'autre à l'électrophorèse à pH 7,15.

Après une électrophorèse qui dura trois heures 30 minutes sous 2,5 V/cm, nos frontières étaient suffisamment séparées pour qu'il nous fût facile de prélever des échantillons assez copieux entre les deux frontières, dans chaque branche du tube en U.

Le schéma ci-devant du tube en U permet de mieux comprendre nos prélèvements.

La fraction I en arrière de la frontière de tête α (vers le pôle +, et en avant de la deuxième frontière β .

La fraction II en arrière de la troisième frontière γ , mais en avant de la quatrième frontière δ .

La fraction III à la base du tube en U doit être un mélange de I et II. Elle est située entre les frontières β et γ .

L'examen optique et l'analyse chimique de la région antérieure à la frontière α montrent qu'il n'existe aucune substance cheminant plus vite que cette frontière. De même, il ne reste rien en arrière de la frontière δ .

Le tableau ci-dessous présente les résultats de nos analyses, exprimés en % de la solution telle qu'elle est dans chaque cas prélevée dans le tube d'électrophorèse (Voir fig. 1).

Zones du tube d'électrophorèse	Azote %	Sucre %
I	0,08	0,06
II	0,06	0,60
III	0,16	0,65

Les résultats analytiques confirment pleinement les observations optiques : nous avons affaire uniquement à deux fractions protéiques qui sont l'une et l'autre homogènes à l'électrophorèse.

La première (I) est pauvre en sucre et riche en azote protéique.

La deuxième (II) est riche en sucre et pauvre en azote protéique.

Si l'on calcule approximativement les teneurs en protéines d'après les teneurs en azote (en multipliant par 6,25), on constate que les teneurs en glucides des fractions I et II sont de l'ordre de :

11 % dans I et 60 % dans II.

(La fraction III, qui est un mélange de I et II, devait avoir évidemment une constitution intermédiaire ; son étude analytique confirme qu'il s'agit bien simplement d'un mélange des solutions I et II).

Les mobilités électrophorétiques de I et II à pH 7,15 dans un tampon phosphaté M/30, et à la température de +20° C sont :

$$\begin{array}{l} \text{pour I : } 3,3 \cdot 10^{-4} \\ \text{pour II : } 1,0 \cdot 10^{-4} \end{array}$$

Nous avons en outre fait des microchromatographies après hydrolyse pour chacune de ces fractions et avons pu identifier certains des acides aminés libérés.

Notons l'extrême richesse en glucides de la fraction II qui cependant se comporte comme homogène à l'électrophorèse. Il s'agit d'un glycoprotéide ou d'une cénapse glucidoprotéique très particulière.

En hommage au parasitologue éminent, spécialiste des Cestodes, notre maître, J. G. BAER de Neuchâtel (Suisse), nous avons proposé dans une note préliminaire, récemment publiée (N. H. KENT et M. MACHEBŒUF, 1947), le terme de *Baerine* pour désigner le glucoprotéide si curieux que nous avons isolé ici dans notre fraction II. Nous réservons le terme de *Moniezine* à l'autre glucoprotéide plus pauvre en sucre, qui constitue la fraction I.

Il se peut que la richesse extrême de la *baerine* en glucides lui confère certaines propriétés biologiques très intéressantes, et nous nous proposons en particulier d'étudier son comportement vis-à-vis des enzymes protéolytiques et glucidolytiques du tube digestif des mammifères, contre lesquels les Ténias ont à lutter pendant leur vie parasitaire.

Étude de la fraction Σ_2 .

Nous appelons Σ_2 la fraction restée dans les eaux-mères lors de la précipitation de Σ_1 par le sulfate d'ammonium à la concentration de 44,6 %. Mais Σ_2 est un résidu infime qui ne représente que 18 mg (dans une expérience où Σ_1 pesait 2600 mg). Aussi n'avons-nous pas poussé très avant l'étude de Σ_2 .

Nous avons simplement cherché à fractionner Σ_2 en ajoutant du sulfate d'ammonium à la solution jusqu'à ce que la moitié environ de Σ_2 soit précipitée. Il a fallu pour cela porter la teneur en sulfate à 57 %. Désignons par $\Sigma_2\alpha$ la fraction précipitée et par $\Sigma_2\beta$ celle restée en solution. Nous avons recueilli cette dernière en la précipitant simplement par acidification légère (pH 4,8), sans modifier la richesse du liquide en sulfate d'ammonium.

$\Sigma_2\alpha$ et $\Sigma_2\beta$ ne contiennent plus du tout de glycogène, mais tandis que α est une protéine non souillée, contenant 16 % d'azote, on note au contraire que β , infime fraction de queue, est très impure et ne contient que 4,3 % d'azote.

Notons que α et β sont solubles dans l'eau et donnent des solutions parfaitement limpides. α est une protéine typique non souillée par des substances agrégées, mais elle n'est présente qu'à doses trop faibles pour qu'une étude ait été possible dans le présent travail.

Notons en outre qu'il s'agit bien de protéines typiques donnant par hydrolyse des acides aminés que nous y avons décelés par microchromatographie.

**Tableau récapitulatif concernant
la composition des fractions extraites par l'eau**

π			Σ_1		Σ_2			
Précipitée par dialyse			Précipitée par sulfate d'ammonium à 44,6 %		Σ_2^a Précipitée par sulfate d'ammonium à 57 %		Σ_2^b Précipitée à pH 4,8	
N %	glucides %	Ac. bil. %	N %	glucides %	N %	glucides %	N %	glucides %
8,6	0	43	10	32	16	0	4,3	0
			séparés par électrophorèse					
			BAERINE					
			pro- téine %	gly- cogène %	pro- téine %	gly- cogène %		
			40	60	89	11		

Résumé des résultats obtenus par l'étude des produits d'extraction par l'eau bidistillée

En somme, l'eau bidistillée enlève aux vers délipidés une série de fractions protéiques, qui sont presque toutes des cénapses dans lesquelles les protéines sont agrégées avec des substances non protéiques.

a) Une cénapse protéines-acide biliaire, très abondante, qui précipite par dialyse prolongée.

b) Une cénapse protéines-glycogène, également très abondante, très riche en glycogène, la *baerine*, qui précipite facilement par le sulfate d'ammonium et se sépare aisément par électrophorèse d'une

autre cénapse protéines-glycogène, beaucoup moins riche en glycogène, la *moniezine*, moins abondante.

c) Une *protéine* (type albumine) très peu abondante, mais libre de toute aggrégation avec des substances organiques.

d) Lorsque les quatre fractions indiquées ci-dessus ont été séparées, il ne reste plus dans les eaux-mères que d'infimes quantités de protéines.

B. EXTRACTION PAR L'EAU SALÉE A 9‰

(Agissant après l'eau bidistillée).

Lorsque l'eau bidistillée n'extrait plus de protéines, nous avons passé à des épuisements par l'eau légèrement salée, en espérant extraire certaines fractions insolubles dans l'eau bidistillée, comme il en existe dans certains cas (euglobulines du sérum, par exemple). Effectivement l'eau légèrement salée a dissous en abondance des protéines restées jusque-là dans la masse solide. Appelons E cette fraction. Nous l'avons facilement subdivisée par dialyse en une fraction E_1 précipitant par dialyse et une fraction E_2 restant en solution malgré l'élimination totale du sel qui avait permis son extraction.

Fait très curieux, la fraction abondante E_1 qui précipite par dialyse ne se remet pas en solution si l'on rajoute du sel, même en présence d'un tampon à pH 7,15. Ici encore, nous voyons donc la dialyse faire séparer une fraction qui est irréversiblement précipitée. Nous avons naturellement pensé qu'il devait s'agir ici, comme dans la fraction π , d'une cénapse avec des acides biliaires. Cette hypothèse était d'ailleurs appuyée par la faible teneur en azote, qui est seulement de 9,1 %. Nous avons donc tenté l'alcoolyse comme dans le cas de la fraction π .

Après 30 heures d'alcoolyse, nous avons repris les expériences comme pour la fraction π . Ici encore, la réaction de PETTENKOFFER nous a donné des résultats concluants. Nous avons donc affaire, de nouveau, aux acides biliaires.

Mais il faut noter un fait important : la fraction E_1 contient 0,34 % de phosphore et elle donne intensément la réaction des acides nucléiques de FEULGEN. D'ailleurs, l'hydrolyse acide libère de petites quantités de sucres réducteurs : 4,2 %. Il s'agit donc de nucléoprotéines (mais elles sont liées à un acide biliaire qui leur confère, comme à π , la propriété de précipiter irréversiblement par dialyse).

Quant à la fraction E_2 , restée soluble après dialyse, elle ne contient pas de phosphore, donc pas d'acide nucléique (réaction de FEULGEN négative), elle est pauvre en azote (8 %) ; il ne doit donc encore une fois pas s'agir de protéines libres. Pour étudier E_2 , nous l'avons précipitée par le sulfate d'ammonium. Il a suffi pour cela d'amener la concentration à 41 % qui précipita pratiquement tout. C'est ici du glycogène qui est uni à la protéine, car la teneur de la fraction en sucres réducteurs, après hydrolyse acide, correspond à 26 % de glucose. Nous retrouvons ici

en somme des propriétés extrêmement voisines de celles de la fraction Σ qu'avait extraite l'eau bidistillée. Peut-être avons-nous même affaire à une partie de Σ que n'avait pas extraite l'eau bidistillée tant que les nucléoprotéides E_1 étaient encore présents. Quoi qu'il en soit, il s'agit encore ici de cénapses glycogéno-protéiques. Nous n'en avons donc pas poursuivi l'étude plus avant dans le présent travail.

Le tableau ci-dessous montre en moyenne les résultats analytiques des différents dosages :

E_1 précipitée par dialyse			E_2 précipitée par sulfate d'ammonium à 41 %		
N % *	P % *	Sucre % *	N % *	P % *	Sucre % *
9,1	0,34	4,2	8	0	26

* Calculés par rapport au poids de l'échantillon séché.

Le dosage du phosphore a été effectué d'après MACHEBŒUF et DELSAL (1943).

Résumé. — L'eau légèrement salée (9 ‰), agissant après l'eau bidistillée, extrait d'une part des cénapses glycogéno-protéiques analogues à celles qu'avait extraites l'eau bidistillée, et d'autre part, des nucléoprotéines typiques (agrégées avec des acides biliaires comme l'étaient certaines holoprotéines extraites par l'eau bidistillée).

En somme la presque totalité des protéines si abondantes que nous avons extraites jusqu'ici par l'eau ou par l'eau salée se trouve être agrégée avec d'autres substances organiques et non à l'état libre.

**Tableau récapitulatif concernant
la composition des fractions extraites par l'eau salée (9 ‰)**

E_1 précipitée par dialyse				E_2 précipitée par du sulfate d'ammonium à 41 %		
N %	P %	glucides %	ac. bil. %	N %	P %	glucides %
9,1	0,34	4,2	25	8	0	26

Réactions : (effectuées sur E_1)

FEULGEN : + (nucléoprotéines)

PETTENKOFFER : + (acides biliaires).

C. EXTRACTION PAR L'EAU FORTEMENT SALÉE (10 %)

Il était à prévoir que les nucléoprotéines ne devaient pas être totalement extraites par l'eau peu salée.

Nous avons donc poursuivi les épuisements en utilisant maintenant de l'eau très salée (contenant 10 % de ClNa). Notre attente ne fut pas déçue, l'eau très salée a extrait une assez abondante fraction protéique N_1 riche en acides nucléiques, mais très riche également en glycogène. Comme dans les autres cas, nous avons soumis l'extrait à la dialyse sous pression et, ici encore, il se forma un abondant précipité N_1 insoluble dans l'eau même en présence de sel, même à pH 7.15. La dialyse ne laissa en solution qu'une très petite fraction N_2 qui, elle aussi, était riche en acides nucléiques (réaction de FEULGEN positive) et en glycogène. Nous avons retrouvé ici encore des acides biliaires.

Le tableau ci-dessous montre en moyenne les résultats des différents dosages :

N_1 précipitée par dialyse			N_2 précipitée par du sulfate d'ammonium à 40 %		
N % *	P % *	Sucre % *	N % *	P % *	Sucre % *
4.5	0.27	56	6	0.52	30

* Calculés par rapport au poids de l'échantillon séché.

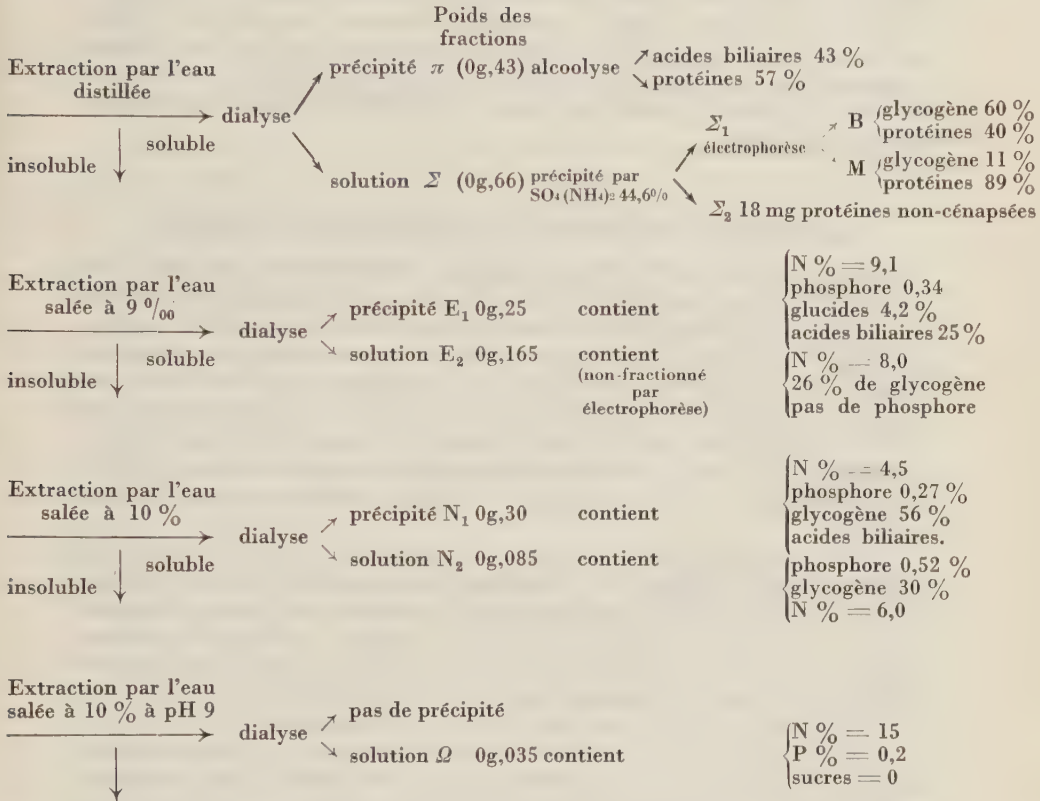
Résumé. — L'eau très salée extrait, comme il fallait s'y attendre, les nucléoprotéines, mais celles-ci sont accompagnées de glycogène et des acides biliaires qui se précipitent avec elles par dialyse pour la fraction (N_1) ou par le sulfate d'ammonium à 40 % pour la petite fraction (N_2). Ici, comme pour les autres fractions par conséquent, nous nous trouvons en présence de protéines agrégées avec des substances non protéiques.

D. EXTRACTION PAR L'EAU TRÈS SALÉE (NaCl 10 %)

EN MILIEU ALCALIN (pH 9)

Pour voir si nos traitements successifs avaient bien extrait toutes les protéines solubilisables, nous avons effectué un contrôle en traitant le résidu par de l'eau très salée, alcalinisée par de la soude, le pH était 9. Il ne s'est extrait qu'une très minime fraction D , qui était constituée par des nucléoprotéines typiques, contenant 15 % d'azote, 0.2 % de phosphore et pas de sucre.

Tableau d'ensemble des rendements
dans une de nos expériences qui porta sur une masse de
Moniezia correspondant à 28 g de matière sèche délipidée



Résidu insoluble R poids sec : 10g,08, soit 36 % de la matière originelle.

Il est évident que ce tableau indique seulement nos rendements tels que nous les avons obtenus sans précautions quantitatives rigoureuses. Il faut cependant noter que les dialyses ont éliminé des masses importantes de substances diffusibles : sels, sucres simples et matières organiques diverses que nous n'avons pas étudiées, puisque nous nous limitons aux recherches sur les protéines.

Notons en outre que d'importantes quantités de glycogène sont libres d'attache avec les protéines et restent avec les eaux-mères lors de la précipitation des fractions protéiques par la dialyse ou par le relargage au moyen de sulfate d'ammonium. C'est ainsi que les eaux-

mères de Σ contiennent quatre fois plus de glycogène (environ) qu'il n'en a précipité avec les protéines lorsqu'on a séparé Σ par le sulfate d'ammonium (concentration en $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2 = 44,6 \%$).

Le résidu définitivement insoluble R est encore très riche en azote (12 %) ; il contient encore une proportion notable de phosphore 0,2 % dont une partie au moins est nucléique, *car la réaction de FEULGEN est fortement positive*. Enfin, par hydrolyse acide, on obtient à partir de R une petite quantité de sucres réducteurs 1,2 %. Etant donné la teneur élevée en azote et la faible teneur en glucides, le résidu R doit être en majeure partie constitué par des scléroprotéines non solubilisables dans l'eau.

Conclusions de l'étude des protéines de *Moniezia*

Les protéines que l'on peut extraire des *Moniezia* délipidés par l'eau pure ou par l'eau salée à diverses concentrations et à divers pH, sont à peu près toutes liées à d'autres constituants organiques en proportions très élevées. Par fractionnement, nous avons pu séparer les cénapses protéines-acides biliaires très abondantes dans le ver et des cénapses protéines-glycogène dont certaines, la *baerine*, sont extrêmement riches en glycogène (60 %). Nous avons pu séparer des fractions très différenciées et même obtenir par électrophorèse deux cénapses glyco-géno-protéiques qui se comportent comme homogènes à l'électrophorèse.

Dans tous les cas, il s'agit bien de protéines typiques, donnant par hydrolyse des mélanges de nombreux aminoacides banaux qu'une étude microchromatographique nous a permis de mettre en évidence.

Dans certaines fractions, nous avons affaire à des nucléoprotéines normales, mais ici encore, nous trouvons une association des protéines avec des substances organiques non protéïdiques qui sont comme dans les autres fractions du glycogène et des acides biliaires.

Il est fort probable que le fait d'être agrégées avec des acides biliaires ou du glycogène confère à toutes les protéines de *Moniezia* des propriétés biochimiques et physicochimiques très particulières, et c'est peut-être là qu'on trouvera, par des travaux ultérieurs, une interprétation du comportement des vers dans le tube digestif de l'hôte et en particulier de leur résistance aux sucs digestifs.

DEUXIÈME PARTIE

Comparaison du *Moniezia* et du *Taenia saginata* basée sur des résultats analytiques

Il était difficile de pratiquer sur le *Taenia saginata* une recherche telle que celle que nous venons de présenter, car les échantillons sont toujours peu copieux et ils ne sont pas souvent obtenus à l'état aussi frais que nous pouvions le souhaiter pour une étude sur les protéines. Nous avons cependant tenu à comparer l'essentiel des faits observés pour *Moniezia* avec ceux que nous pourrions observer sur un *Taenia*. Pour résumer cette brève étude comparative, nous nous contenterons de présenter deux tableaux de chiffres analytiques, obtenus parallèlement sur *Moniezia* et sur un échantillon de *Taenia saginata*. Nous n'avons pas ici cherché à fractionner par des dialyses portant systématiquement sur toutes les fractions. Nous avons simplement analysé les divers extraits tels que nous les avons obtenus.

D'une comparaison aussi sommaire, nous ne pouvons pas tirer des conclusions précises. On peut cependant noter combien le traitement par l'eau bidistillée donne pour les deux vers des résultats analogues. Il doit bien y avoir dans le *Taenia*, comme dans *Moniezia*, des cénapses glycogéno-protéiques très riches en glycogène (type Baerine), extractibles par l'eau bidistillée.

Par contre, les fractions extraites seulement par l'eau salée ou l'eau très salée ne contiennent pas de glycogène agrégé avec les protéines. Nous n'avons pas poursuivi l'étude de ces fractions dans le cas du *Taenia saginata*, car nos échantillons étaient trop peu abondants.

Pour savoir si le *Taenia* contenait comme *Moniezia* des cénapses protéines-acides biliaires, nous avons cependant étudié la fraction π_1 du *Taenia* et nous y avons trouvé des acides biliaires.

En somme, les faits que nous avons mis en évidence ne peuvent pas être exactement transposés au *Taenia saginata*, mais des analogies existent manifestement.

RÉSUMÉ ET RAPPEL DES CONCLUSIONS

En congelant, puis en broyant à froid des Cestodes, puis en les soumettant à l'action prolongée d'alcool absolu très froid, puis d'éther, on leur enlève des lipides et il devient possible d'extraire en abondance par l'eau, puis par l'eau salée, des protéines. Le fait même de pratiquer l'extraction par étapes successives : eau distillée, puis eau faiblement salée (9 pour mille), puis eau fortement salée (10 pour cent) permet d'obtenir directement des extraits protéiques bien différenciés.

L'eau non salée n'extraît pas de nucléoprotéines, mais d'abondantes fractions non phosphorées.

Si l'on soumet l'extrait à la dialyse sous pression, de façon à éliminer les sels et les substances dialysables, tout en concentrant considérablement la solution, on provoque la précipitation des protéines accompagnées d'acides biliaries qui leur sont intimement liés, puisque la dialyse ou des lavages à l'eau ne les enlèvent pas. Le précipité mixte protéines-acides biliaries est insoluble dans l'eau, même en présence de sel, même en milieu neutre ou légèrement alcalin. Il s'agit d'une fraction très particulière, constituée en somme par des cénapses protéines - acides biliaries dont on ne peut arracher les acides biliaries que par un traitement prolongé à l'alcool bouillant, qui dénature les protéines.

L'existence de telles cénapses protéines-acides biliaries avait été soupçonnée dans le sérum sanguin des malades atteints d'ictère par rétention (TAYEAU), mais on n'en avait pas isolé jusqu'ici. Elles sont très abondantes dans *Moniezia expansa*.

A côté de ces cénapses protéines-acides biliaries, l'eau distillée extrait également en abondance des cénapses protéines-glycogène et aussi du glycogène libre d'attache avec les protéines. Les cénapses protéines-glycogène restent en solution lors de la dialyse, mais elles précipitent facilement par addition à la solution de 44 % de sulfate d'ammonium qui laisse le glycogène libre en solution, ainsi que de très petites quantités de protéines libres d'attaches avec le glycogène.

L'ensemble des cénapses protéines-glycogène se dissout aisément dans l'eau et se fractionne facilement par électrophorèse en deux parties bien distinctes : l'une de haute mobilité ($3,3 \cdot 10^{-4}$) à pH 7,15 et à 20° C, l'autre de mobilité beaucoup plus faible ($1,0 \cdot 10^{-4}$).

Chacune de ces parties est caractérisée à l'électrophorèse par une frontière remarquablement stable et nette et se comporte comme homogène. La cénapse lente est extrêmement riche en glycogène (environ 60 %), nous lui avons donné le nom de *baerine* en hommage au professeur BAER, notre maître, éminent spécialiste des Cestodes. Cette *baerine* est le premier exemple connu d'une cénapse glycogéno-protéique isolée.

Des cénapses glycogéno-protéiques avaient jusqu'ici seulement été soupçonnées dans le muscle des mammifères (WILLSTAETTER et RHOEWALD, puis PRZYLECKI), mais non isolées et jamais obtenues à l'état d'homogénéité électrophorétique.

L'autre fraction séparée par électrophorèse, la fraction de haute mobilité, est également une cénapse glycogéno-protéique homogène à l'électrophorèse, mais elle est beaucoup moins riche en glycogène (11 %) : nous l'appelons *moniezine* pour rappeler son origine zoologique.

Lorsque les épuisements par l'eau distillée sont achevés, le résidu non soluble des vers est soumis à des épuisements par l'eau salée à 9 % qui dissout encore de petites quantités de cénapses glycogéno-protéiques et un peu de nucléoprotéines typiques, mais celles-ci précipitent irréversiblement par dialyse et elles sont associées avec des acides biliaires comme l'étaient les holoprotéines qui précipitaient par dialyse dans les extraits obtenus par l'eau non salée.

Des épuisements ultérieurs des vers par l'eau fortement salée (10 %) extraient en abondance des nucléoprotéines qui, toutes, sont associées à du glycogène en proportion élevée. Une partie de ces nucléoprotéines précipite par dialyse et nous retrouvons ici encore des acides biliaires agrégés comme dans toutes les fractions nucléoprotéiques ou holoprotéiques qui précipitent irréversiblement par dialyse.

Les épuisements successifs par l'eau, par l'eau peu salée et par l'eau très salée, ont bien enlevé pratiquement toutes les protéines, autres que les scléroprotéines, car des épuisements par l'eau très salée et alcalinisée n'enlèvent plus que d'infimes quantités de protéines (qui sont d'ailleurs encore des nucléoprotéines). Il reste finalement un résidu insoluble qui paraît riche en scléroprotéines.

De tout ceci se dégage un fait très particulier : la presque totalité des protéines que l'on peut extraire du *Moniezia* se trouve à l'état de cénapses et non à l'état libre. Une partie était liée à des acides biliaires, une autre partie à du glycogène. Quelques fractions nucléoprotéiques sont même liées à la fois à du glycogène et à des acides biliaires.

La proportion de protéines libres que l'on peut extraire représente moins de 1 % de l'ensemble des protéines. Ce fait nous semble intéressant, car il est sûrement particulier aux vers parasites, puisque les autres cellules vivantes (autres peut-être que certaines cellules glandulaires) ne contiennent pas des quantités d'acides biliaires et de glycogène suffisantes pour qu'une proportion élevée de leurs protéines soit agrégée à ces substances. Peut-être faut-il voir là un fait en rapport avec la résistance du Cestode à la digestion par les enzymes protéolytiques qui caractérisent le milieu dans lequel il vit.

BIBLIOGRAPHIE

- BAER, J. G. — (1946). Le parasitisme, F. Rouge & C^{ie} (Lausanne) ; Masson & C^{ie} (Paris).
- BOYDEN, A. — (1934). Systematic serology and its relation to general biology. *Amer. Nat.* **68**.
- (1942). *Physiol. zool.* **15**.
- BRAND, Th. — (1933). Stoffbestand und Stoffwechsel von *Moniezia expansa*. *Z. Vergl. Physiol.* **18** : 562.
- (1939). Chemical and morphological observation upon the composition of *Macracanthorhynchus hirudinalis*. *J. of Parasit.* **25** : 329.
- CONSDEN, R., GORDON A. H. and MARTIN, P. — (1944). Qualitative analysis of proteins ; a Partition chromatographic method using paper. *Biochem. J.* **38** : 224.
- DESCHIENS, R. — (1947). Données relatives à l'intoxication vermineuse expérimentale. *C. R. Acad. Sc.* **224** : 689.
- EISENBRANDT, L. — (1938). On the serological relationship of some helminths. *Amer. J. of Hyg.* **27** : n° 1, 117.
- FOLIN, O. — (1928). Colorimetrical estimation of glucose. *J. Biol. chem.* **77** : 421.
- KENT, N. et MACHEBŒUF, M. — (1947^a). Recherche sur les protéines des cestodes. *Rev. suisse de bactériol. et pathol.* **10** (sous presse).
- KENT, N. et MACHEBŒUF, M. — (1947^b). Sur l'existence de cénapses protéines-acides biliaires dans les cestodes. *C. R. Acad. Sc.* **225** : 539.
- KENT, N. et MACHEBŒUF, M. — (1947^c). Sur l'existence de cénapses glycoprotéiques dans un cestode (*Moniezia expansa*). *C. R. Acad. Sc.* **225** : 602.
- MACHEBŒUF, M. et TAYEAU, R. — (1942). Les protéides de la graine d'arachide. (Cinq mémoires). *Bull. Soc. Chim. Biol.* **24** : 260, 268, 273, 277, 281.
- MACHEBŒUF, M. et HELLOT, R. — (1947). Les protéides de la graine d'arachide (*Arachis Hypogea*). *Bull. Soc. Chim. Biol.* **29** (sous presse).
- MACHEBŒUF, M. et MONNIER. — (1941). Appareil permettant la séparation de fractions protéiques. *C. R. Soc. Biol.* **135** : 1241.
- MACHEBŒUF, M. et DELSAL, J. — (1943). Sur le dosage de très petites quantités de phosphore dans les matières organiques. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **25**.
- PRZYLECKI, S. J. — (1931). Untersuchungen über die Bindung der Bio-kolloide. *Biochem. Zeit.* **240** : 98.
- (1932). Bindungen zwischen Amylopektin und Eiweisskörpern oder ihren Abkömmlingen. *Biochem. Zeit.* **245** : 388.
- PRZYLECKI, S. J. — (1932). Geronnenes Ovalbumin und verschiedene Kohlenhydrate. *Biochem. Zeit.* **248** : 16.

- (1932). Eiweiss und Nukleinsäure sowie deren Abbauprodukte. *Biochem. Zeit.* **251** : 248.
- (1933). Ueber Synthetische Nukleoproteide. *Biochem. Zeit.* **258** : 79.
- (1934). Ueber die Verbindung Myosin-Polysaccharid. *Biochem. Zeit.* **273** : 262.
- REID, W. M. — (1942). Certain nutritional requirement of the fowl cestode *Raillietina cesticillus* as demonstrated by short periods of starvation of the host. *J. of Parasit.* **28** : n° 4, 319.
- SALISBURY, F. — (1939). Concerning the chemical composition of *Cysticercus fasciolaris*. *J. Biol. Chem.* **129** : 504.
- SMORODINTZEV, A. et BEBESHINE — (1936). Distribution of glycogen in tapeworms. *C. R. Acad. Sc. U. R. S. S.* **3** : (8) n° 9.
- SMORODINTZEV, A. et PAVLOVA, I. — (1936). Répartition de l'azote des fractions albumineuses dans le corps des taenias. *Ann. parasitol.* **14** : 489.
- SANDOR, G. — (1933). Contribution au problème des protéides. Thèse. Paris.
- TAYEAU, R. — (1944). Le système lipidoprotéidique du sérum sanguin chez les malades atteints d'ictère. Thèse médecine. Bordeaux.
- TISELIUS, A. — (1930). Thèse Upsala. *Koll. Zeit.* **85** : 129. *Trans. Faraday Soc.* **33** : 524.
- VONK, J. — (1947). La présence d'acides biliaries et la résorption des acides gras chez les invertébrés. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **29** : 94.
- WILLSTAETTER und RHOEWALD. — (1934). Ueber den Zustand des Glykogens in der Leber, im Muskel und in Leukocyten. *Zeit. für Physiol. Chem.* **225** : 103.
- WRIGHT, H. and GONZALES, J. — (1943). Electrophoretic studies on antibodies to *Trichinella spiralis*, in the rabbit. *J. Infect. Dis.* **72** : 242.

